

临床分离 40 株单纯疱疹病毒血清型的鉴定

沈 茜 唐家琪 指导: 汪美先

(第四军医大学微生物学教研室, 陕西, 西安)

单纯疱疹病毒 (HSV) 感染的病原学检测和病毒血清型鉴定、对疾病的诊断和治疗均有重要意义。HSV 与疱疹病毒科的巨细胞病毒、EB 病毒、水痘一带状疱疹病毒间均有一定交叉反应, 而 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 和 II 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 两个血清型间交叉反应更为严重, 所以 HSV 的血清型鉴定是个棘手的问题。目前用于 HSV 分型的方法主要有计算 PN 值的中和试验^[1]、SPA 菌体协同凝集试验^[2]、免疫荧光试验^[3]、型特异性单克隆抗体^[4]和病毒 DNA 限制性内切酶分析^[5]等。本文参照 Stalder 的方法^[6], 以计算 Δtc 的微量中和试验对临床标本中分离的 40 株病毒进行血清型别鉴定, 以了解不同部位 HSV 感染的型别特征; 同时, 对微量中和试验进行 HSV 分型的可靠性及实用性作一评价。

材 料 和 方 法

1. 细胞: 传代地鼠肾细胞 (BHK₂₁C₁₃) 引自军事医学科学院。生长液为 10% 小牛血清 199 培养基, 维持液为 3% 小牛血清 199 培养基。

2. 病毒: HSV-1 SM₄₄ 株, 引自北京生物制品所; HSV-2 SaV 株, 引自成都生物制品研究所。经 BHK 细胞多次传代, 微量法滴定感染性分别为 $10^{-5.5}$ 、 10^{-5} 。40 株待鉴定的病毒, 系用原代乳兔肾细胞 (PRK) 自口腔粘膜、面部皮肤、唇部、泪液和宫颈分泌物标本中分离出, 经 BHK 细胞传代 3 次, 均出现 HSV 典型的细胞病变 (CPE)。

3. 免疫血清的制备: 将 HSV-1 SM₄₄ 株和 HSV-2 SaV 株分别感染 PRK 细胞单层, 收获感染细胞, 制备粗制抗原。以 10^5 TCID₅₀ 病毒量皮下多点接种家兔, 每周一次, 至酶联免疫吸附试验间接法检测抗体效价为 10^{-5} 以上, 放血分

离血清。使用前血清用生理盐水做 1:2 稀释, 65℃ 30 分钟灭活。

4. 微量培养板处理: 聚苯乙烯微量培养板 (上海塑料三厂, 4 × 10 孔, 平底) 按组织培养要求清洗 Co⁶⁰ 照射灭菌备用。

5. 病毒滴定: HSV-1、HSV-2 及待鉴定病毒株用生长液做系列 10 倍稀释, 每稀释度滴入微量培养板 10 个孔内, 每孔一滴 (0.05ml)。然后每孔补加生长液 0.05 ml。用生长液制备 BHK 细胞悬液 40 万/ml, 每孔加入 2 滴 (0.1ml)。透明胶纸密封后 37℃ 培养, 96 小时后根据细胞病变的出现, 按 Reed 法^[7] 计算感染滴度 (TCID₅₀/0.05ml)。

6. 微量中和试验: 参照 Stalder^[6] 方法加以改进。兔抗 HSV-1、HSV-2 免疫血清分别用生长液从 1:5—1:80 做系列倍比稀释, 病毒用生长液稀释成大约 200 TCID₅₀/0.05ml。每孔分别加入 1 滴, 每个血清稀释度滴加 4 个孔, 振荡 1 分钟混匀后, 37℃ 作用 1 小时。每孔加入 BHK 细胞悬液 2 滴 (40 万/ml), 透明胶纸密封后 37℃ 培养, 96 小时后判读结果。

设细胞对照、免疫血清对照, 每株鉴定病毒设 1000、100、10、1、0.1 TCID₅₀/0.05ml 病毒对照。

7. 资料处理: 按 Reed 法^[7] 计算两型病毒免疫血清的 50% 血清中和终点, 并计算病毒实际接种量 (TCID₅₀/0.05 ml), 对血清的中和终点进行校正。根据下列公式计算 Δtc , 以 Δtc 值作为病毒血清型别的判定指标。

公式: $\Delta tc = tc(\text{HSV-1}) - tc(\text{HSV-2})$ (1)

Δtc : 两型病毒标准免疫血清对同一病毒的 tc 差值。

tc : 将病毒实际接种量校正到 100 TCID₅₀/0.05ml 时, 血清 50% 中和效价的对数。

$$tc = t - b(c - a - 2) \quad (2)$$

t : 50% 血清中和终点的对数。

c : 病毒感染性滴度的对数 (TCID₅₀/0.05 ml)

a : 为鉴定病毒接种稀释度的对数。

b : 斜率

结 果

(一) 病毒滴度与血清 50% 中和终点间的直线关系及回归系数的测定

用系列倍比稀释的兔抗 HSV-1、HSV-2 免疫血清, 分别中和 30—240 TCID₅₀/0.05ml 实际接种量的 HSV-1、HSV-2 标准株, 按上述方法判定结果。病毒感染性滴度与 50% 血清中和终点间存在一线性关系, 结果见图 1 (图中每一数值为 3 次试验的平均值)。HSV-1 与兔抗 HSV-1 间直线回归方程的回归系数 $b =$

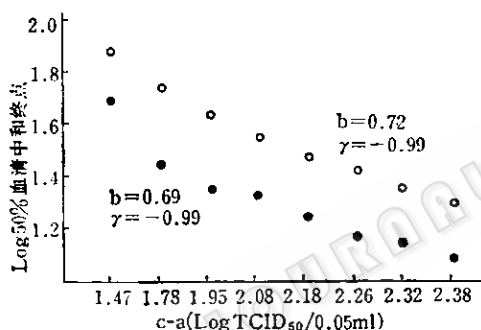


图 1 病毒滴度与 50% 血清中和终点的关系

- HSV-1, 兔抗 HSV-1 免疫血清
- HSV-2, 兔抗 HSV-2 免疫血清
- $c - a$ 为病毒感染性滴度的对数-鉴定病毒接种稀释度的对数

表 1 HSV-1 和 HSV-2 Δtc 范围的测定结果

HSV 标准毒株	$c-a$	t HSV-1	t HSV-2	tc HSV-1	tc HSV-2	Δtc
HSV-1	1.50	1.60	1.30	1.25	0.94	0.31
HSV-1	1.75	1.60	1.30	1.43	1.13	0.30
HSV-1	2.00	1.30	0.90	1.30	0.90	0.40
HSV-1	2.00	1.45	0.93	1.45	0.93	0.52
HSV-1	2.10	1.35	0.85	1.49	0.99	0.50
HSV-2	1.50	1.36	1.67	1.01	1.31	-0.30
HSV-2	1.75	1.35	1.76	1.52	1.94	-0.42
HSV-2	1.33	1.45	1.76	0.99	1.28	-0.29
HSV-2	1.70	1.67	1.90	1.46	1.68	-0.22
HSV-2	2.00	1.20	1.40	1.20	1.40	-0.20

表 2 40 株分离 HSV 血清型别鉴定的结果

鉴定病毒	临床标本来源	$c-a$	t HSV-1	t HSV-2	tc HSV-1	tc HSV-2	Δtc
1	OM	2.50	1.40	0.92	1.75	1.28	0.47
2	OM	2.00	1.40	0.90	1.40	0.90	0.50
3	FS	1.67	1.79	0.94	1.56	0.70	0.86
4	OM	1.67	1.65	0.84	1.42	0.60	0.82
5	OM	2.33	1.20	0.56	1.43	0.80	0.63
6	OM	1.67	1.60	0.95	1.37	0.71	0.66
7	OM	3.00	1.10	0.70	1.79	1.42	0.38
8	OM	3.00	1.10	0.70	1.79	1.42	0.38
9	OM	3.00	1.15	0.70	1.80	1.42	0.38
10	LP	2.67	1.30	1.25	1.30	1.25	0.05
11	OM	2.67	1.15	1.20	1.61	1.68	-0.07
12	OM	2.67	1.30	0.85	1.76	1.33	0.43
13	EY	2.50	1.20	0.85	1.55	1.20	0.34
14	EY	2.50	1.00	0.70	1.35	1.06	0.29
15	LP	2.00	1.60	1.00	1.60	1.00	0.60
16	OM	3.00	1.10	0.70	1.79	1.42	0.37
17	OM	2.33	1.30	1.00	1.54	1.24	0.30
18	OM	2.50	1.30	1.00	1.65	1.35	0.30
19	OM	2.30	1.40	0.75	1.61	0.97	0.64
20	OM	2.00	1.50	0.85	1.50	0.85	0.65
21	FS	2.50	1.35	0.70	1.70	1.06	0.64
22	FS	2.50	1.40	0.90	1.75	1.26	0.49
23	CV	1.37	1.30	1.40	0.86	0.95	-0.09
24	CV	2.33	1.51	1.76	1.73	1.99	-0.26
25	CV	2.33	1.75	1.30	1.99	1.54	0.45
26	CV	2.00	1.51	1.91	1.51	1.91	-0.40
27	CV	1.70	1.45	1.67	1.24	1.46	-0.22
28	CV	1.70	1.67	1.90	1.46	1.68	-0.22
29	CV	2.00	1.45	1.76	1.45	1.76	-0.31
30	CV	2.00	1.20	1.45	1.20	1.45	-0.24
31	CV	1.30	1.65	1.70	1.17	1.18	-0.01
32	CV	1.33	1.51	1.70	1.04	1.22	-0.18
33	CV	1.33	1.23	1.70	0.76	1.22	-0.46
34	CV	2.33	1.34	1.23	1.59	1.47	0.12
35	CV	2.00	1.30	1.60	1.30	1.60	-0.30
36	CV	2.00	1.03	1.70	1.03	1.70	-0.62
37	CV	2.00	1.45	1.15	1.45	1.15	0.30
38	CV	1.50	1.30	1.65	0.95	1.30	-0.34
39	CV	1.33	1.80	2.10	1.33	1.62	-0.29
40	CV	2.00	1.60	2.10	1.60	2.10	-0.50

FS: 面部皮肤, EY: 眼泪, LP: 唇部, OM: 口腔粘膜, CV: 子宫颈。

0.69, $r = -0.99$; HSV-2 与兔抗 HSV-2 血清间直线回归方程的回归系数 $b = 0.72$, $r = -0.99$ 。

(二) HSV-1 和 HSV-2 Δtc 范围的确定

用系列倍比稀释的兔抗 HSV-1、HSV-2 免疫血清分别中和实际接种量为 100 TCID₅₀/0.05ml 的 HSV-1 及 HSV-2 标准株,结果见表 1。中和 HSV-1 的 Δt_c 均值为 0.406 ± 0.103 ($\bar{x} \pm SD$); 中和 HSV-2 的 Δt_c 均值为 -0.286 ± 0.086 。因此,本试验系统中 $\Delta t_c \geq 0.20$ 时判为 HSV-1; $\Delta t_c \leq -0.114$ 时判为 HSV-2; Δt_c 位于二值之间者判为中间型。

(三) 对临床分离 40 株 HSV 型别鉴定的结果

40 株临床分离的 HSV 型别鉴定的结果见表 2。 $\Delta t_c \geq 0.20$ 者 22 株,判为 HSV-1; $\Delta t_c \leq -0.114$ 者 13 株,判为 HSV-2; $-0.114 \leq \Delta t_c \leq 0.20$ 者 5 株判为中间型,占 12.5%。自口腔粘膜、泪液、唇、面部皮肤标本中分离到的 22 株 HSV 中,有 20 株为 HSV-1(90.9%), 2 株为中间型(9.1%)。自宫颈分泌物标本中分离到的 18 株 HSV 中,13 株为 HSV-2(72.2%), 2 株为 HSV-1(11.1%), 3 株为中间型(16.7%)。

讨 论

HSV 血清型型别的鉴定,有助于疾病的治疗、预后及流行病学研究。由于两型 HSV 的 DNA 有 50% 相同,因此,免疫血清有严重的交叉反应。用 HSV-1、HSV-2 标准株免疫血清的中和试验,对 HSV 分离株进行型别鉴定,只能反映量的差异,不能反映质的差异,这种量的差异也是比较小的。本文采用的计算 Δt_c 的微量中和试验,对这种量的差异进行精确的处理和计算。计算 Δt_c 的方法通过校正,计算出免疫血清对 100 TCID₅₀/0.05ml 实际接种量 HSV 的 50% 中和滴度的差值,排除了病毒接种量不同所致的误差,提高了鉴别的准确性。

从临床标本中分离的 40 株病毒,在实际接种量为 100 TCID₅₀/0.05ml 时,均可为 1:10 稀释的兔抗 HSV-1 或兔抗 HSV-2 标准株免疫血清所中和(表 2),不出现细胞病变,因此可确定为 HSV。根据滴定的 Δt_c 范围,其中 22 株判为 HSV-1; 13 株判为 HSV-2; 5 株无法确定型别,判为中间型。文献报道^[8],当用免疫血

清对 HSV 进行型别鉴定时,约有 34% 的分离株无法确定型别,即所谓的“中间型”。本文鉴定的 40 株 HSV 分离株中,亦有 5 株(12.5%)无法判定型别,对这些分离株的型别鉴定,将寄希望于型特异性单克隆抗体技术。本文中自口腔粘膜、泪液、面部皮肤等处分离到的 22 株 HSV 中,经鉴定 20 株为 HSV-1, 2 株为中间型;自宫颈分泌物中分离到的 18 株 HSV 中,13 株为 HSV-2(72.2%), 2 株为 HSV-1(11.1%), 3 株为中间型。这些感染部位 HSV 型别分布的特点,与文献报道^[9,10]的一致。

在预试验时,曾试图用两型 HSV 标准株感染的 BHK 细胞交叉吸收两型免疫血清(1×10^7 个细胞/ml 血清),以去除免疫血清中抗型共同性抗原的成分,再用这种免疫血清对临床分离株做型别鉴定。然而,吸收后免疫血清的效价明显下降,以致有些分离株即使用 1:5 稀释的免疫血清中和,也会出现细胞病变,不能得出明确结果。

HSV 血清型别的鉴定方法,以 DNA 限制性内切酶分析及型特异性单克隆抗体分析最为可靠,然而,由于这两种方法均需特殊的试剂或条件,至今只能在少数实验室进行。本文介绍的计算 Δt_c 微量中和试验,无需特殊的设备和材料,可以在任何有组织培养条件的实验室进行。通过对 40 株临床分离 HSV 的血清型鉴定,获得较满意的结果,从而表明这个方法具有较好的准确性。由于采用微量中和试验,将血清和病毒同时滴入微板孔内直接中和。这样,简化了操作程序,缩短了操作时间,节省材料,加速了临床分离病毒的鉴定工作。目前,HSV 的发病率逐年上升^[11], HSV 与头颈部鳞状上皮癌和宫颈癌也有关^[12]。由于计算 Δt_c 的微量中和试验,简便、快速、较准确,可以在短时间内完成多样本的检测鉴定工作,因此,在目前型特异性单克隆抗体分型等法尚不能普及和大量应用时,这个方法可适于大规模的流行病学调查及临床分离病毒株的鉴定。

参 考 文 献

- [1] Pauls FP: *J Immunol*, 98: 941, 1967.
- [2] Mogensen SC: *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect (B)*, 91: 83, 1983.
- [3] Nahmias AJ: *Appl Microbiol*, 22: 455, 1971.
- [4] Niheden E: *J Clin Microbiol*, 17: 677, 1983.
- [5] Goldstein LC: *J Infect Dis*, 147: 829, 1983.
- [6] Stalden H: *J Infect Dis*, 131: 423, 1975.
- [7] Reed LJ: *Am J Hyg*, 27: 493, 1938.
- [8] Crange MP: *J Med Virol*, 11: 295, 1983.
- [9] Nahmias AJ: The laboratory diagnosis of Herpes Simplex Virus infections-prospects and problem. In *Diagnosis Horizons*. Bethesda, Microbiological Associates, 1: 1—7, 1977.
- [10] Nahmias AJ: *N Engl J Med*, 289: 657, 1973.
- [11] Turmen IS: *Can Med Assoc J*, 125: 23, 1981.
- [12] Nctler MFD: *Cancer Res*, 36: 4394, 1976.